BULLETIN du MUSÉUM NATIONAL d'HISTOIRE NATURELLE

PUBLICATION BIMESTRIELLE

sciences physico-chimiques

11

N° 424 NOVEMBRE-DÉCEMBRE 1976

BULLETIN
du
MUSÉUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE

57, rue Cuvier, 75005 Paris

Directeur : Pr M. Vachon.

Comité directeur : Prs J. Dorst, C. Lévi et R. Laffitte.

Conseillers scientifiques : Dr M.-L. Bauchot et Dr N. Hallé.

Rédacteur : Mme P. Dupérier.

Le *Bulletin du Muséum national d'Histoire naturelle*, revue bimestrielle, paraît depuis 1895 et publie des travaux originaux relatifs aux diverses branches de la Science.

Les tomes 1 à 34 (1895-1928), constituant la 1re série, et les tomes 1 à 42 (1929-1970), constituant la 2e série, étaient formés de fascicules regroupant des articles divers.

A partir de 1971, le *Bulletin* 3e série est divisé en six sections (Zoologie — Botanique — Sciences de la Terre — Sciences de l'Homme — Sciences physico-chimiques — Écologie générale) et les articles paraissent, en principe, par fascicules séparés.

S'adresser :

— pour les **échanges**, à la Bibliothèque centrale du Muséum national d'Histoire naturelle, 38, rue Geoffroy-Saint-Hilaire, 75005 Paris (C.C.P., Paris 9062-62) ;

— pour les **abonnements** et les **achats au numéro**, à la Librairie du Muséum, 36, rue Geoffroy-Saint-Hilaire, 75005 Paris (C.C.P., Paris 17591-12 — Crédit Lyonnais, agence Y-425) ;

— pour tout ce qui concerne la **rédaction**, au Secrétariat du *Bulletin*, 57, rue Cuvier, 75005 Paris.

Abonnements pour l'année 1977

Abonnement général : France, 530 F ; Étranger, 580 F.
Zoologie : France, 410 F ; Étranger, 450 F.
Sciences de la Terre : France, 110 F ; Étranger, 120 F.
Botanique : France, 80 F ; Étranger, 90 F.
Écologie générale : France, 70 F ; Étranger, 80 F.
Sciences physico-chimiques : France, 25 F ; Étranger, 30 F.

International Standard Serial Number (ISSN) : 0027-4070.

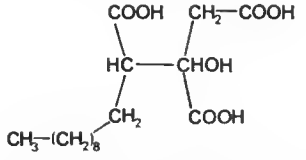
BULLETIN DU MUSÉUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE
3e série, nº 424, novembre-décembre 1976, Sciences physico-chimiques 11

Application de la RMN du Carbone-13 à la détermination de la biosynthèse d'un métabolite des Champignons : l'acide spiculisporique

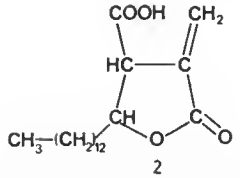
par Bernard Bodo, Marcel Massias, Lucie Molho, Darius Molho et Suzanne Combrisson *

Abstract. — ^{13}C NMR spectra of spiculisporic acid enriched with [1-^{13}C] and [2-^{13}C] sodium acetate by the fungus *Penicillium funiculosum*, atypic, show its biosynthetic origin from condensation of lauric acid produced by the acetate-polymalonate pathway and α-ketoglutaric acid related to the tricarboxylic cycle.

On connaît chez les Lichens et les Champignons un groupe d'acides aliphatiques dont la structure est caractérisée par une longue chaîne alkyle reliée à une plus courte portant plusieurs fonctions carboxyliques. Ces dernières peuvent, dans certains cas, être sous la forme d'esters internes pour former des γ lactones. On peut citer, comme exemples-types, l'acide décyl-citrique **1**, métabolite de Champignons, et l'acide protolichestérinique **2** produit par divers Lichens du genre *Cetraria*.



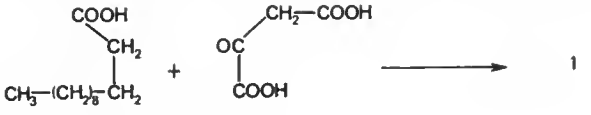
1



2

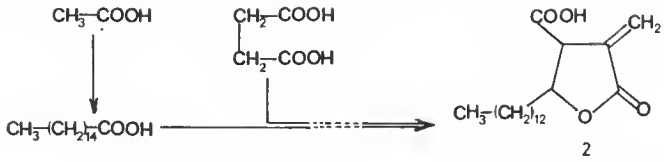
D'après la structure qui a été assignée à ces composés, il est possible d'interpréter leur biogenèse en admettant la condensation d'un acide gras à longue chaîne avec une unité, généralement en C-4, issue du cycle tricarboxylique.

Ainsi l'acide décyl-citrique **1** dérive d'un point de vue formel de la condensation du carbonyle de l'acide oxalacétique avec le méthylène en α du carboxyle de l'acide laurique (**1**).



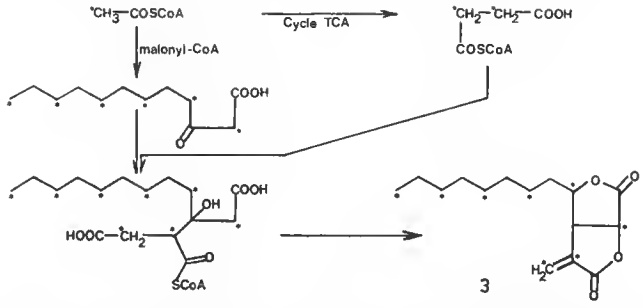
* B. Bodo, M. Massias, L. Molho, D. Molho, *Laboratoire de Chimie appliquée aux Corps organisés, Muséum national d'Histoire naturelle, 63, rue de Buffon, 75005 Paris.*
S. Combrisson, *Laboratoire de Chimie organique de l'École supérieure de Physique et Chimie, 10, rue Vauquelin, 75005 Paris.*

La biosynthèse de l'acide protolichestérinique **2** a été élucidée par Bloomer et coll. (**2**, **3**, **4**) au moyen de précurseurs radioactifs (^{14}C). Ces auteurs ont montré qu'il était formé effectivement par condensation d'une molécule d'acide palmitique, issue d'une biosynthèse acétique-polymalonique, avec une molécule en C-4 (l'acide succinique) issue du cycle tricarboxylique puisque l'acide acétique et l'acide succinique ont été incorporés dans les positions attendues ; une décarboxylation ultérieure conduit à l'acide protolichestérinique.



Mais la difficulté d'obtenir des incorporations importantes des précurseurs par les Lichens, par suite de leur lente croissance, a rendu l'analyse de l'incorporation de l'acide succinique délicate.

Ce type de biosynthèse, impliquant la condensation d'un acide à longue chaîne linéaire avec une unité issue du cycle tricarboxylique a été suggéré par Mentzer (**5**) et démontré par Tanabe et coll. (**6**) pour l'avénaciolide **3**, métabolite d'*Aspergillus avenaceus*. L'acide oxo-3 décanoïque formé par la voie acétique-polymalonique est condensé avec le succinyl-coenzyme A. Le triacide intermédiaire obtenu est ensuite transformé en avénaciolide **3**.

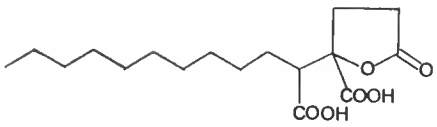


Nous avons examiné la biosynthèse de l'acide spiculisporique **4**, métabolite de différents *Penicillium* (**7**, **8**, **9**) dont *P. spiculisporum* Lehman et *P. funiculosum* Thom. atypique. Cet acide peut être rattaché au groupe de produits naturels que nous venons de décrire, bien que sa biosynthèse implique la condensation d'un acide gras à longue chaîne avec cette fois une unité à cinq atomes de carbone — l'acide α cétoglutarique — issue également du cycle tricarboxylique.

Gatenbeck (**10**, **11**) a réalisé une synthèse enzymatique de cet acide à partir de lauryl-coenzyme A et d'acide α cétoglutarique en utilisant des enzymes extraits de *Penicillium spiculisporum*.

Nous avons étudié cette biosynthèse en suivant l'incorporation d'acide acétique marqué, par *Penicillium funiculosum* atypique, pour former l'acide spiculisporique. Nous avons choisi de travailler avec un précurseur marqué au Carbone -13 et d'analyser le produit formé par la spectrométrie de RMN, ce qui permet de mieux localiser la marque et d'éviter les opérations de fragmentations chimiques de la molécule inévitables avec le mar-

quage au carbone -14. Il fallait donc dans un premier temps attribuer chacun des signaux du spectre de RMN de l'acide spiculisporique naturel aux différents atomes de carbone de cette molécule. Puis nous avons comparé à ce spectre ceux de l'acide spiculisporique enrichi en Carbone -13 par les précurseurs marqués.



4

ATTRIBUTION DES SIGNAUX

L'attribution des signaux du spectre de RMN du C-13 de l'acide spiculisporique naturel (fig. 1 a) aux différents atomes de carbone de cette molécule est fondée d'une part sur la comparaison du spectre « off-resonance » et du spectre totalement découplé et d'autre part sur le calcul des déplacements chimiques théoriques des atomes de carbone de la chaîne.

Comme il existait encore des incertitudes pour l'observation et l'attribution des atomes de carbone du cycle lactonique dont les signaux apparaissent dans des massifs, nous avons préparé un dérivé de l'acide spiculisporique — l'anhydride correspondant **5** — que nous avons également analysé en RMN du Carbone -13.

La comparaison des spectres totalement découplés et « off-resonance » de l'acide spiculisporique **4** montre que le signal à 13,9 ppm correspond à un méthyle, ceux à 22,0 et 31,2 ppm à deux méthylènes (—CH_2—), celui à 50,8 ppm à un carbone tertiaire (—CH<) et ceux à 85,8, 172,0, 173,0 et 175,7 ppm à des carbones quaternaires. Le signal à 85,8 ppm doit être attribué au carbone -14 qui porte un atome d'oxygène et celui à 175,7 ppm au carbonyle lactonique. Les atomes de carbone des carbonyles lactoniques apparaissent à champ plus faible que les carbonyles d'acides (**12**) dont les déplacements chimiques sont ici de 172,0 et 173,0 ppm. Les deux massifs situés vers 28 et 29 ppm ne renferment que des groupes méthylènes.

Nous avons calculé les déplacements théoriques des atomes de carbone de la chaîne en appliquant la règle de GRANT et PAUL (**13**), modifiée par LINDEMAN et ADAMS (**14**) qui permet de calculer *a priori* le déplacement chimique dans le cas des alcanes. Nous avons ensuite tenu compte des incréments dus aux substituants. Ces paramètres ont été déterminés par ROBERTS, JACKMAN et HAGEN (**15**, **16**, **17**).

Le déplacement du kième atome de carbone est donné par la relation :

$$\Delta_c\,(k) = B_s + \sum_{M=2}^{4} D_M\, A_{sM} + \gamma_s\, N_{k3} + \Delta s\, N_{k4}$$

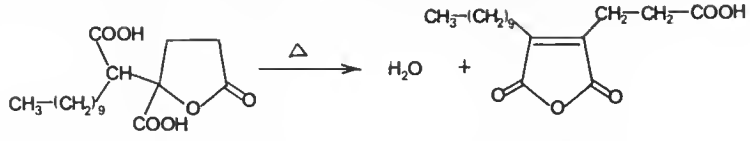
ou B_s, A_{sM}, γ_s et Δs sont des constantes ; N_{KP} est le nombre d'atomes de carbone à P liaisons du carbone k, D_M est le nombre d'atomes de carbone liés au carbone k.

Le résultat des attributions est consigné dans le tableau I. On observe une bonne concordance entre les valeurs calculées et les valeurs trouvées expérimentalement.

TABLEAU I. — Valeurs des déplacements chimiques.

	Acide spiculisporique **4** δ ppm		Anhydride **5** δ ppm
	trouvé	calculé	trouvé
C-1	13,9	13,9	13,9
C-2	22,0	22,6	22,0
C-3	31,2	32,4	31,2
C-4		29,7	
C-5	28,9	30,0	28,7
C-6	29,0	30,0	28,9
C-7		30,0	
C-8		30,0	
C-9	27,2	27,9	27,1
C-10	27,6	28,2	23,6
C-11	50,8		144,4
C-12	173,0		165,8
C-13	172,2		166,0
C-14	85,8		142,7
C-15			19,4
C-16			31,0
C-17	175,7		172,9

Il est difficile de localiser avec précision, comme on l'a vu, les signaux des atomes de carbone -15 et -16 de l'acide spiculisporique qui apparaissent dans l'un et l'autre des massifs à 27 et 29 ppm. Or, il est important de les distinguer pour mesurer leur enrichissement lors des expériences de marquage. Dans ce but nous avons transformé l'acide spiculisporique en l'anhydride correspondant **5** par chauffage vers 175°C sous pression réduite.

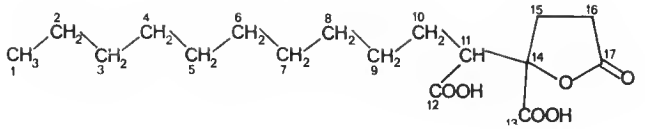


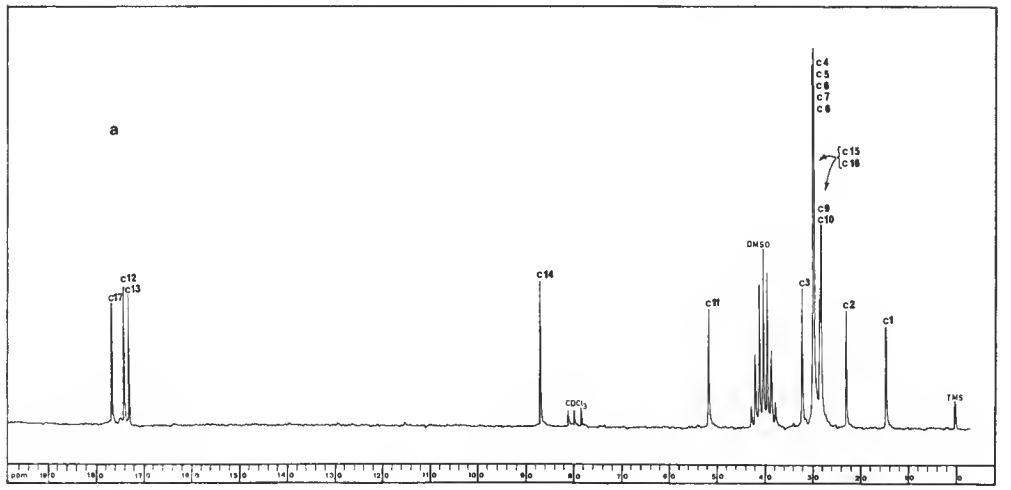
4 5

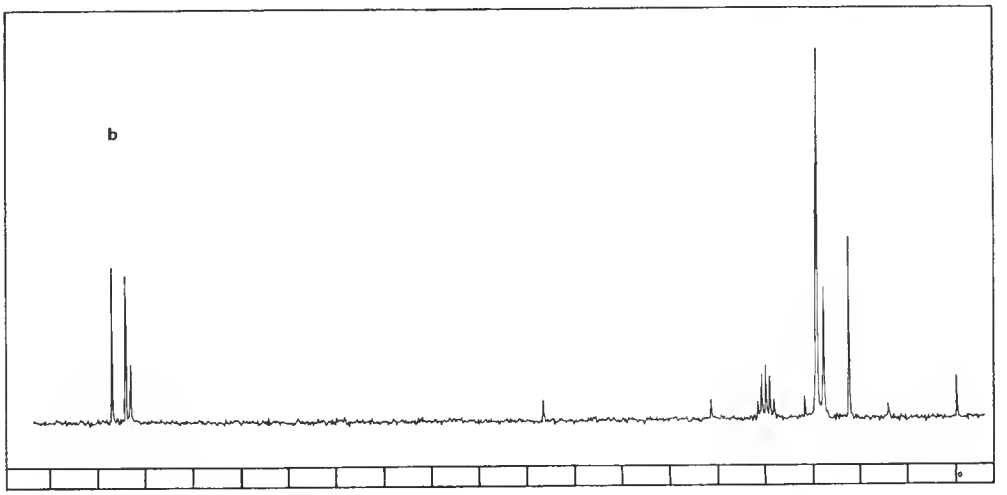
Le spectre de RMN du Carbone.-13 de cet anhydride **5** (fig. 2) dont les valeurs des déplacements chimiques sont consignées dans le tableau I met bien en évidence les carbones -15 et -16 à 19,4 et 31,0 ppm respectivement. Les carbones -12 et -13 apparaissent à 165,8 et 166,0 ppm, positions voisines de celles des carbonyles de l'anhydride maléique (**18**) ce qui est en accord avec la structure indiquée pour **5**.

INCORPORATION D'ACIDE ACÉTIQUE MARQUÉ : MÉTHODE ET RÉSULTATS

Le champignon *Penicillium funiculosum* est mis en culture de surface sur un milieu Czapek-Dox stérile auquel est ajouté le précurseur — acétate de sodium — marqué. La







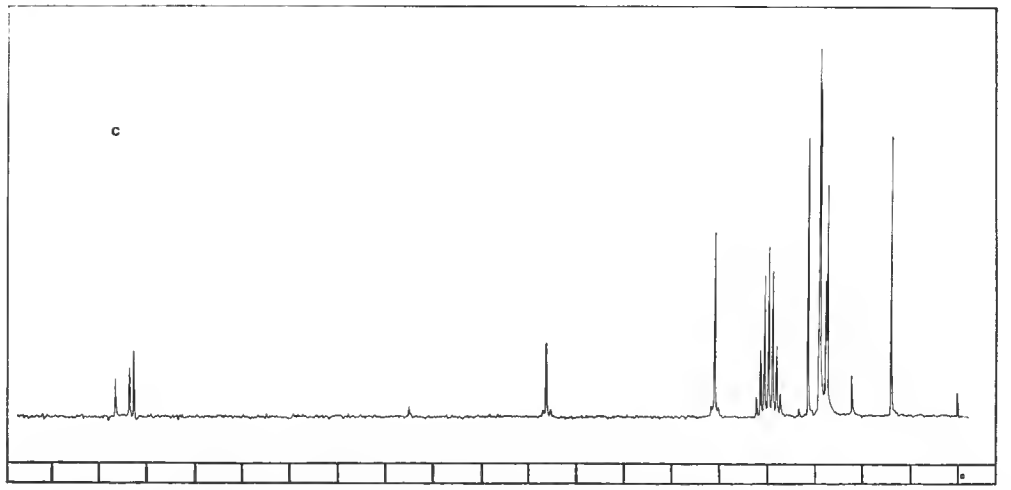
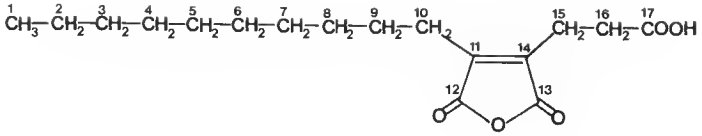
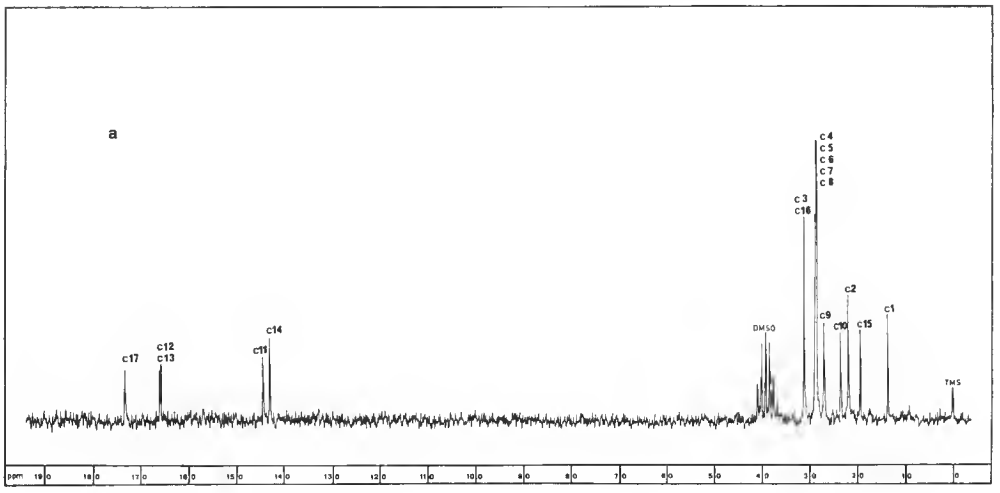
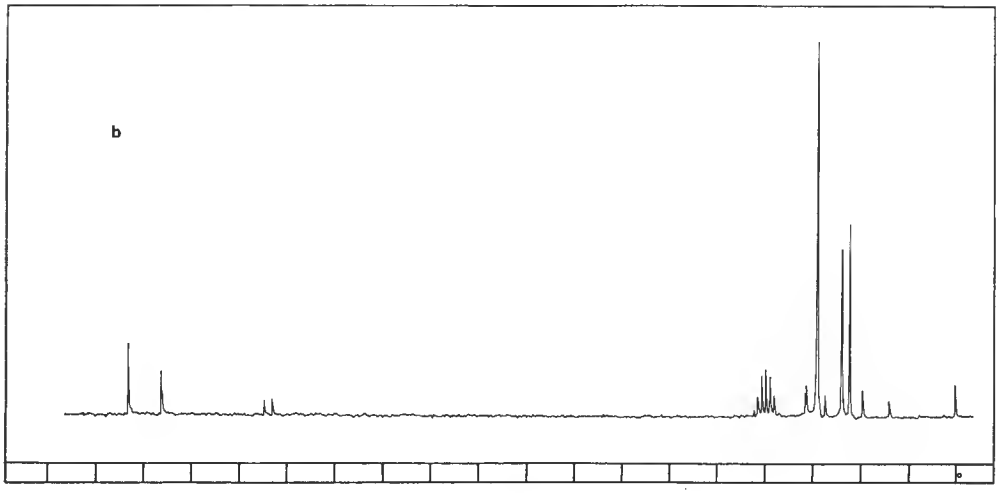


FIG. 1. — a, Spectre de RMN du ^{13}C de l'acide spiculisporique **4** naturel ; b, spectre après incorporation d'acide acétique marqué sur le carbone -1 (CH_3-$^{13}COOH$) ; c, spectre après incorporation d'acide acétique marqué sur le carbone -2 ($^{13}CH_3$-COOH).







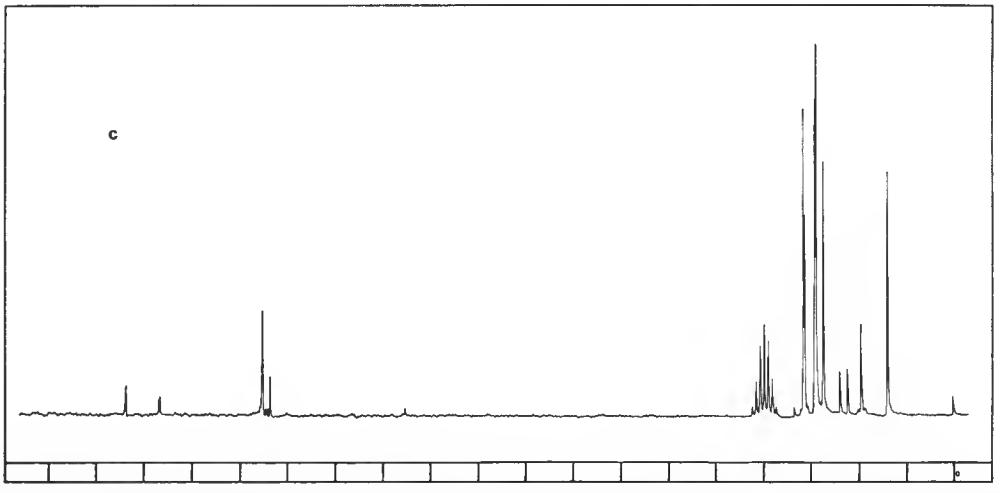


FIG. 2. — a, Spectre de RMN du ^{13}C de l'anhydride **5** ; b, spectre après incorporation d'acide acétique marqué sur le carbone -1 (CH_3-$^{13}COOH$) ; c, spectre après incorporation d'acide acétique marqué sur le carbone -2 ($^{13}CH_3$-COOH).

culture est poursuivie pendant 15 jours à 24°C, à l'obscurité sans agitation ni aération. Le mycelium est alors essoré, séché et extrait. L'acide spiculisporique est isolé de l'extrait brut par chromatographie sur colonne de gel de silice.

Des expériences ont été réalisées en utilisant successivement comme précurseurs l'acide acétique marqué sur le carbone -1 (CH_3-$^{13}COOH$) et sur le carbone -2 ($^{13}CH_3$-COOH). Les spectres de RMN de l'acide spiculisporique obtenu dans chacune de ces expériences sont représentés respectivement dans les figures 1b et 1c.

La figure 1b (spectre après incorporation de CH_3-$^{13}COOH$) fait apparaître une augmentation importante de l'intensité relative des signaux des atomes de carbone -2, 4, 6, 8, 10 et 12 de la chaîne. Le taux d'enrichissement est d'environ 7 %. Le signal dû au carbone -17 est aussi augmenté et de façon sensiblement égale ; en revanche, le signal du carbone -13 subit un accroissement faible. Ces données impliquent une incorporation du carbone -1 de l'acide acétique dans ces positions de l'acide spiculisporique.

La figure 1c (spectre après incorporation de $^{13}CH_3$-COOH) montre une augmentation de l'intensité des signaux des atomes de carbone alternants et complémentaires de la chaîne : on observe, en effet, un accroissement relatif des signaux des atomes de carbone -1, 3, 5, 7, 9, et 11 de la chaîne ainsi que du carbone -14 pour lequel on observe par ailleurs un couplage (J = 36Hz) avec le carbone -11.

Ces résultats sont confirmés par l'analyse des spectres de l'anhydride **5** dérivant de l'acide spiculisporique (fig. 2 b et 2 c). Ces spectres permettent en plus de préciser que le carboxyle de l'acide acétique ne s'incorpore pas dans les positions -14, 15 et 16. En revanche, le méthyle de l'acide acétique s'incorpore dans ces positions. En effet, on note un fort accroissement du signal correspondant au carbone -16 et un plus faible pour les carbones -14 et 15.

Interprétation et conclusions

L'acide acétique marqué est transformé dans un premier temps en acétyl-coenzyme A qui intervient aussi bien dans la formation des acides gras que dans le cycle tricarboxylique.

Formation de la chaîne

L'acétyl-coenzyme A initie la chaîne qui est allongée par du malonyl-coenzyme A, formé par carboxylation de l'acétyl-coenzyme A. Il se produit ensuite une décarboxylation et une réduction des carbonyles cétoniques (voie acétique-polymalonique) (schéma 1).

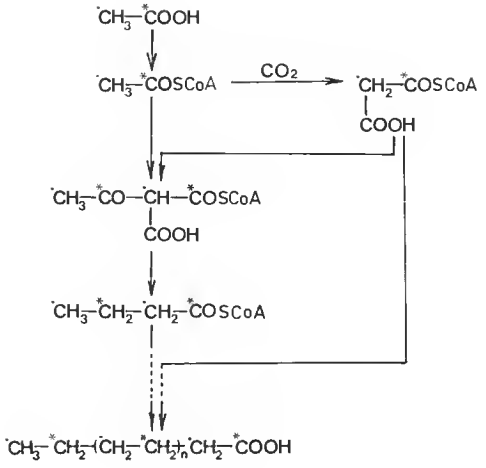


Schéma 1

Le fait qu'on observe une marque sur les atomes de carbone alternés de la chaîne indique qu'elle a une origine acétique-polymalonique.

Incorporation de l'acide acétique dans le cycle tricarboxylique

L'acide acétique, sous la forme d'acétyl-coenzyme A intervient dans le cycle tricarboxylique. En schématisant, dans un premier temps il est condensé avec l'acide oxalacétique pour donner une molécule d'acide citrique, laquelle est oxydée et décarboxylée en acide α cétoglutarique. Il faut noter que, malgré la symétrie de la molécule d'acide citrique, les systèmes enzymatiques qui la transforment en acide α cétoglutarique ne sont pas symétriques et donc que les groupes carboxyles -1 et -5 de cette molécule ne sont pas équivalents. Il en résulte que le carbone -1 de l'acide acétique est incorporé surtout dans le carbone -5 de l'acide α cétoglutarique.

Les étapes suivantes, en revanche, forment successivement de l'acide succinique puis l'acide oxalacétique. La dissymétrie des unités se perd au niveau de l'acide succinique et la marque de l'acide acétique se disperse comme cela est indiqué dans le schéma simplifié 2.

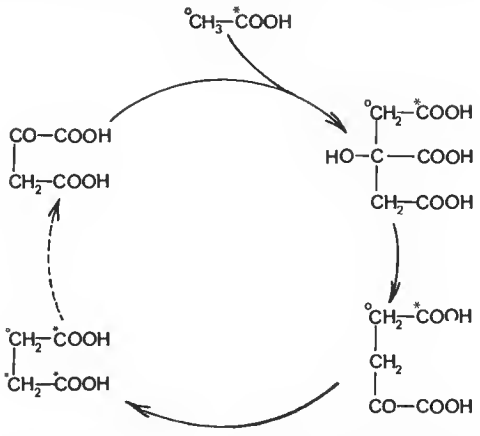


Schéma 2

Les résultats obtenus sont en accord avec cette hypothèse. On observe, en effet, qu'après incorporation d'acide acétique CH_3-$^{13}COOH$, le carbone -17 de l'acide spiculisporique, issu du carbone -5 de l'acide α cétoglutarique, est marqué de façon notable, alors que le carbone -13 (issu du carbone -1 de l'acide α cétoglutarique qui ne peut être marqué qu'après un tour complet du cycle) l'est, mais très faiblement par suite d'une dilution dans le cycle tricarboxylique.

De même, après incorporation d'acide acétique $^{13}CH_3$-COOH, on remarque une augmentation importante du signal du carbone -16 de l'anhydride **5**, issu du carbone -4 de l'acide α cétoglutarique et une plus faible pour les carbones -14 et -15 issus des carbones -2 et -3 de l'acide α cétoglutarique. La dissymétrie de l'acide citrique dans son utilisation est clairement mise en évidence dans cette expérience. De plus, ceci indique que l'acide α cétoglutarique formé dans le cycle tricarboxylique par condensation d'une molécule d'acide acétique et d'une molécule d'acide oxalacétique est utilisé, pour l'essentiel, directement sans qu'il accomplisse plusieurs tours du cycle. Cependant, la faible marque

observée pour les carbones -13, 14 et 15 de l'acide spiculisporique montre qu'une partie mineure effectue un ou plusieurs tours du cycle.

La jonction des deux unités — acide laurique et acide α cétoglutarique — se manifeste par l'apparition d'un couplage (J = 36Hz) entre les atomes de carbone marqués -11 et -14 lors de l'incorporation d'acide acétique [2-^{13}C].

L'acide spiculisporique est donc formé *in vivo* par condensation d'une molécule d'acide laurique provenant de la voie acétique-polymalonique et d'une molécule d'acide α cétoglutarique synthétisé dans le cycle tricarboxylique comme cela est explicité dans le schéma 3.

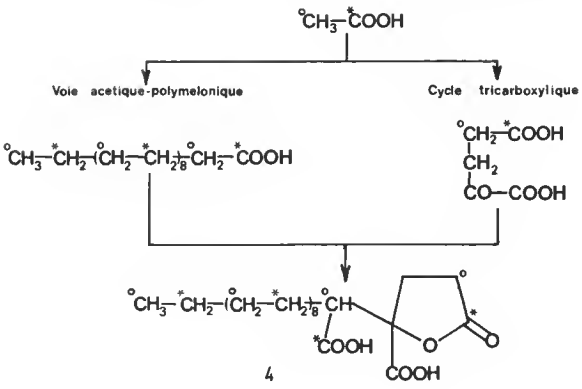


Schéma 3

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Une culture de *Penicillium funiculosum* Thom. atypique (détermination CBS ; déposé sous le n° 2101 à la Mycothèque du Muséum national d'Histoire naturelle, Paris) a été développée sur un milieu Czapek-Dox, en fioles de Roux contenant chacune 180 cm³ de milieu, pendant 5 jours à 24°C, sans agitation et à l'obscurité. On ajoute alors une solution aqueuse stérile d'acétate de sodium marqué au Carbone-13 (100 mg d'acétate par fiole). On laisse la culture se poursuivre pendant 15 jours dans les mêmes conditions. Le mycelium est ensuite essoré et séché, et extrait en continu par de l'éther. Le milieu de culture est par ailleurs acidifié et extrait plusieurs fois à l'éther. Les solutions éthérées sont rassemblées et concentrées. Le résidu obtenu est chromatographié sur colonne de gel de silice avec comme éluant le mélange benzène-dioxanne-acide acétique (45/12,5/2). L'acide spiculisporique obtenu est cristallisé dans un mélange acide acétique-eau (50/50) puis dans l'eau [Fusion = 145°C, Litt. : F = 145°C (7)]. L'identité du produit isolé avec l'acide spiculisporique a été vérifiée par l'analyse de ses spectres de RMN du proton, d'absorption dans l'infrarouge et de masse.

Les spectres de RMN du Carbone -13 ont été enregistrés pour des solutions dans le diméthylsulfoxyde (D6) sur un spectrographe Varian XL 100. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm (δ), le tétraméthylsilane étant pris comme référence interne.

Formation de l'anhydride décyl-4 (carboxy-2 éthyl)-3 maléique **5**

58 mg d'acide spiculisporique sont chauffés vers 175°C, sous 5 mm de pression pendant 30 mn. On recueille un liquide visqueux (44 mg). Ses caractéristiques spectrales conduisent à attribuer à ce composé la structure **5**.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. W. B. Turner, Fungal metabolites, Academic Press, New York and London, 1971.
2. J. L. Bloomer, W. R. Eder et W. F. Hoffman, *Chem. Comm.*, 1968 : 354.
3. J. L. Bloomer et W. F. Hoffman, *Tetrahedron Lett.*, 1969 : 4339.
4. J. L. Bloomer, W. R. Eder et W. F. Hoffman, *J. chem. Soc* (C), 1970 : 1848.
5. C. Mentzer, Comparative phytochemistry, ed. T. Swain, Academic Press, 1966 : 26.
6. M. Tanabe, T. Hamasaki, Y. Suzuki et L. F. Johnson, *Chem. Comm.*, 1973 : 212.
7. P. W. Clutterbuck, H. Raistrick et M. L. Rintoul, *Phil. Trans. r. Soc.* London, 1931, **220** B : 301.
8. A. E. Oxford et H. Raistrick, *Biochem. J.*, 1934, **28** : 828.
9. M. Asano et S. Kameda, *J. pharm. Soc. Japan*, 1941, **61** : 80.
10. S. Gatenbeck et A. Mahlen, *Antibiot. Advan. Res. Prod. Clin. Use*, Prague, 1964 : 540 ; *Chem Abstr.*, 1967, **66** : 44470 v.
11. S. Gatenbeck et A. Mahlen, *Acta chem. scand.*, 1968, **22** : 2613.
12. G. C. Levy et G. L. Nelson, Carbon-13 nuclear magnetic resonance for organic chemists, Wiley-interscience. N. Y., London, 1972.
13. D. M. Grant et J. Paul, *J. am. chem. Soc.*, 1964, **86** : 2984.
14. L. P. Lindeman et J. Q. Adams, *Analyt. Chem.*, 1971, **43** : 1245.
15. J. D. Roberts, F. J. Weigert, J. I. Kroschwitz et H. J. Reich, *J. am. chem. Soc.*, 1970, **92** : 1338.
16. L. M. Jackman et D. P. Kelly, *J. chem Soc.* (B), 1970 : 102.
17. R. Hagen et J. D. Roberts, *J. am. chem. Soc.*, 1969, **91** : 4504.
18. L. F. Johnson et W. C. Jankowski, Carbon-13 NMR Spectra, Wiley-interscience, N. Y., London, 1972.

Manuscrit déposé le 19 juillet 1976.

Bull. Mus. natn. Hist. nat., Paris, 3e sér., nov.-déc. 1976, n° 424, Sciences physico-chimiques 11 : 53-62.

Achevé d'imprimer le 28 février 1977.

IMPRIMERIE NATIONALE

6 564 004 5

Recommandations aux auteurs

Les articles à publier doivent être adressés directement au Secrétariat du *Bulletin du Muséum national d'Histoire naturelle*, 57, rue Cuvier, 75005 Paris. Ils seront accompagnés d'un résumé en une ou plusieurs langues. L'adresse du Laboratoire dans lequel le travail a été effectué figurera sur la première page, en note infrapaginale.

Le *texte* doit être dactylographié à double interligne, avec une marge suffisante, recto seulement. Pas de mots en majuscules, pas de soulignages (à l'exception des noms de genres et d'espèces soulignés d'un trait).

Il convient de numéroter les *tableaux* et de leur donner un titre ; les tableaux compliqués devront être préparés de façon à pouvoir être clichés comme une figure.

Les *références bibliographiques* apparaîtront selon les modèles suivants :

Bauchot, M.-L., J. Daget, J.-C. Hureau et Th. Monod, 1970. — Le problème des « auteurs secondaires » en taxionomie. *Bull. Mus. Hist. nat., Paris*, 2e sér., 42 (2) : 301-304.

Tinbergen, N., 1952. — The study of instinct. Oxford, Clarendon Press, 228 p.

Les *dessins* et *cartes* doivent être faits sur bristol blanc ou calque, à l'encre de chine. Envoyer les originaux. Les *photographies* seront le plus nettes possible, sur papier brillant, et normalement contrastées. L'emplacement des figures sera indiqué dans la marge et les légendes seront regroupées à la fin du texte, sur un feuillet séparé.

Un auteur ne pourra publier plus de 100 pages imprimées par an dans le *Bulletin*, en une ou plusieurs fois.

Une seule épreuve sera envoyée à l'auteur qui devra la retourner dans les quatre jours au Secrétariat, avec son manuscrit. Les « corrections d'auteurs » (modifications ou additions de texte) trop nombreuses, et non justifiées par une information de dernière heure, pourront être facturées aux auteurs.

Ceux-ci recevront gratuitement 50 exemplaires imprimés de leur travail. Ils pourront obtenir à leur frais des fascicules supplémentaires en s'adressant à la Bibliothèque centrale du Muséum : 38, rue Geoffroy-Saint-Hilaire, 75005 Paris.

MUSEUM
NATIONAL
D'HIST.NAT.